

辣椒转基因研究进展^{*}

谷 维

(黑龙江省农科院作物营养实用技术研究所 哈尔滨 150086)

摘要: 概括了辣椒转基因技术、抗病、虫和除草剂转基因辣椒研究的进展。并对今后的辣椒转基因育种工作提出了建议。

关键词: 辣椒; 育种; 转基因

中图分类号: S 641.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2006)05-0114-04

Advances of the Research on Transgenic Capsicum Crop

GU Wei

(Crop Nutrition and Practical Technique Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: The recent research progresses in transgenic technology of the peppers and transgenic breeding of the peppers with resistance to diseases, insects and herbicides were summarized, and some proposals for future advance in the fields were put forward in the paper.

Key words: capsicum crop; breeding; transgene

辣椒是一种非常重要的园艺作物,既可鲜食,又可作调味品,还有多种药用价值,在全世界广泛栽培。我国栽培面积甚大,已成为世界上主要的辣椒出口国。为了加快辣椒品种更新换代的速度,国内外对辣椒分子育种技术的研究非常重视,现已在转基因方面的研究取得重大进展。

植物基因转化是利用分子生物学和基因工程技术将外源基因插入到受体植物的基因组,并使其在后代植株中得以表达的过程。转基因植物就是植物细胞或组织经遗传转化后,通过组织培养诱导出愈伤组织,再经诱导分化形成完整植株。转基因可以使优良生物基因在不同生物之间进行交流,从而弥补单一生物种类中的遗传资源不足,丰富种质库。转基因植物的研究在目前的生物技术领域中最为活跃,具有十分广泛的应用前景^[1]。

植物转基因常用的方法有农杆菌介导转化法、微弹轰击法⁵、基因枪法⁶、聚乙二醇法、电穿孔法、声波法及花粉途径法等^[2,3]。辣椒转基因最常用的是根癌农杆菌介导的叶盘转化法,此法操作简单易行,转化效率较高。目前常用的根癌农杆菌是

LBA4404 菌株。辣椒遗传转化常用的报告基因有新霉素磷酸转移酶基因(NPT-II)、卡那霉素抗性基因(Km)和胭脂碱合成基因(NOS)等,尤其以卡那霉素抗性基因最为常用^[2]。

1 转基因辣椒技术研究

Liu^[4] (1990)首先报道用根癌农杆菌进行辣椒遗传转化,在转化的外植体上有冠瘿结构和分化的芽,但不能诱导芽伸长,未能获得转基因植株。王慧中等^[5] (1994)用茄门辣椒茎尖及下胚轴切段,能被含Ti质粒pC27的根癌农杆菌感染,该质粒带有一个基因以供选择卡那霉素抗性的转化辣椒细胞。以下胚轴为外植体,转化频率为19.3%,以茎尖为外植体,转化频率可达21.4%,共得转基因绿苗6株。定性测定酶活性结果表明,卡那霉素抗性绿苗含有与枸杞转化苗移率相同的酶带,而非转化绿苗则不含有这种酶带。用DNA特异性探针进行DNA分子杂交结果表明,只有卡那霉素抗性的绿苗中提取的DNA有与基因同源的片段,而从非转化的绿苗

* 收稿日期: 2006-04-04

作者简介: 谷维(1974-),男,黑龙江省海林市人,助研,主要从事植物营养和生物技术工作; E-mail: guwei_link@yahoo.com.cn.
1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中提取的 DNA 则没有这种同源 DNA 片段存在, 说明外源的 NPT - II 基因通过 Ti 质粒为载体的基因转移技术已导入辣椒细胞, 并得到抗卡那霉素的正常转基因植株。

王玉文等^[6] (1991) 以子叶为外植体, 用叶盘法进行甜椒的基因转化工作, 筛选出侵染性强的菌株 C58 和 GV111, 并检测到 GUS 基因在甜椒子叶上的短期表达, 在含 50 mg/L 卡那霉素培养基上已获得抗性芽。

叶志彪等^[7] (1993) 用改建的农杆菌的 4 个辣椒品种的子叶进行转化, 不同品种的差异很大。湘研 1 号的转化再生率最高, 为 42%; 华椒 17 次之, 为 18%, 陇椒 1 号和早丰 1 号较低, 分别为 12% 和 9%。Southern blot 是从湘研 1 号的再生芽幼叶中提取总 DNA, 酶切电泳及转移后, 用 1Kb NPT - II 探针杂交, 结果显示, 所测 9 株再生苗都含有 NPT - II 基因, 其拷贝数有单份至多份。

袁静等^[8] (2003) 设置农杆菌类型、辣椒基因型、外植体、vir 基因活化培养基、方法等 5 个因素, 研究了利用根癌农杆菌介导法的辣椒遗传转化效果。以获得卡那霉素抗性芽外植体频率为指标, 发现农杆菌菌株类型和辣椒基因型对转化效率都有较大影响, 直接影响着转化效率。

2 抗病毒转基因辣椒研究

关于辣椒的基因转化, Liu 等首先报道了用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 转化辣椒无病毒苗的子叶和下胚轴, 转化的外植体上有冠瘿瘤结构, 可是只有器官分化, 并没有得到完整的转基因植株。虽然他们使用的质粒 P31 - GUS 只带有报告基因, 但为利用基因工程技术改良辣椒品种特性开辟了一条崭新的途径。随后, 由于目的基因分离技术的日臻完善, 获得了更多、更新的有用基因。例如, 抗病毒的基因有: 黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因 (CMV - CPgene)、CMV 卫星 - RNA cDNA 以及辣椒严重花叶病毒外壳蛋白基因 (peSMV - CPgene) 等。

Pablo Daniel Rabinowicz 等从被侵染的烟草植株中分离得到了 peSMV - CPgene。他们在 pUC13 上克隆了该基因, 并在 m13 噬菌体上进行了亚克隆, 获得了 peSMV 基因组的部分核苷酸序列, 其中包括复制酶基因 3' 端在内的 1329 bp。研究表明, 该基因的序列有 71.6% 与 PVY - CP 的同源, 其推算的氨基酸序列与 PVP 和 TEV 的比较, 分别有 80.9% 和 62.1% 的同源性。值得一提的是蚜虫并

不传播 peSMV 病毒。

1986 年, Beachy 等首次把烟草花叶病毒外壳蛋白基因转化烟草得到了延迟发病的转基因植株, 从而提供了转入病毒外壳蛋白基因实现植物抗病毒分子育种的研究实例。

周钟信等^[9] (1991) 对西郊青椒 1 号子叶外植体进行 CMVcp 基因转化处理和培养, 用头孢霉素抑菌, 用卡那霉素筛选转化体, 得到了少量的再生小植株。对转化体小植株叶片电泳分析的结果表明有胭脂碱的表达, 标样显示两个绿色荧光亮点, 精氨酸在前, 胭脂碱在后; 而非转化辣椒只呈现一个荧光点, 从其位置看显然是精氨酸, 说明转化体辣椒细胞内精氨酸的一部分在胭脂碱合成酶的催化下被用来合成了胭脂碱, 从而证实了外源胭脂碱合成酶基因在转化体辣椒细胞中得到了表达。因为该基因与 CMVcp 基因均组装在 T - DNA 上, 因此也间接证明了 CMVcp 基因已整合到辣椒转化细胞的基因组中。

毕玉平等^[10] (1999) 在构建 TMVcp 和 CMVcp 双价表达载体和建立辣椒高效转化体系的基础上, 用农杆菌介导法转化辣椒栽培品种农大 40 和湘研 1 号, 经卡那霉素筛选得到 52 个再生株, 用放射性标记的基因探针进行点杂交和 PCR 检测, 表明目的基因已整合到辣椒核基因组中, 获得了转基因植株。

李华平等^[11] (2000) 用华椒 17 为转基因受体材料, 以农杆菌共培养法转化 CP 基因, 分别以辣椒子叶、幼茎和根为受体, 进行了 3 批共 639 个植物组织的转化实验。结果表明, 经农杆菌转化的子叶、幼茎和根都能在含有卡那霉素的培养基上形成愈伤组织, 但只有子叶才能够从愈伤组织进一步分化成幼芽和根。经 PCR 和 Southern blot, Northern blot 杂交检测, 表明转化的植株显示了明显的杂交信号。选取具有 CP 基因转录的 32 株植株, 利用 DAS - ELISA 法对 CP 基因的翻译进行分析, 表明所有具有 CP 基因转录的植株都有 CP 蛋白的表达。

Murphy 等^[12] (1994) 在建立辣椒原生质体再生植株的基础上, 用电激法介导辣椒斑点病毒、烟草蚀纹病毒和黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因, 在原生质体接种病毒 24 ~ 48 h 后, 用 Western blot 检测出上述 3 种病毒外壳蛋白的积累, 利用这种方法在 5 个辣椒品种上获得成功。

张宗江等^[13] (1994) 借助二元 TC 载体系统, 用农杆菌与子叶外植体共培养, 进行黄瓜花叶病毒外壳蛋白 (CMVcp) 基因转化山鹰椒、海花 3 号和中椒 2

号等3个辣椒品种的工作,经过抗卡那霉素的筛选和再生培养,得到转基因植株。经过对后代植株的DNA和RNA分子杂交以及蛋白质ELISA检测表明,转基因株后代染色体上带有CMV_{cp}基因,在叶片中表达出CMV_{cp},经过对表达植株叶面接种CMV病毒,表现出明显的抗CMV病毒的性能。

董春枝等^[14](1995)通过农杆菌将CMV卫星-RNA cDNA基因导入番茄的子叶和辣椒的子叶柄,获得转基因植株后,用无卫星-RNA的恶性花叶病毒株进行CMV接种。聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)及Northern blotting分析表明,在转基因植株中CMV卫星RNA基因确有表达。对照组相比,大部分转基因植株要推迟到10 d左右表现出CMV的症状,而且病情指数下降,CMV发育减慢。

Zhang等^[15](1996)也通过农杆菌把CMV-CPgene导入甜椒,获得了3株含CMV-CPgene的R1株系,Western blotting分析表明,其中的一株有较高的外源基因表达产物,但其他两株的信号相对较弱。

谢立波^[16](2000)将CmV、TmV外壳蛋白基因通过花粉管通道法及Ri质粒介导法导入甜椒中,建立适于甜椒基因植物转化体系,创造甜椒CMV、TMV抗原材料,填补当前甜椒抗病种质资源短缺,为甜椒抗病毒育种做贡献。

3 抗细菌、真菌转基因辣椒研究

目前已知的抗性细胞主要有抗菌肽类(CecropinA, B, D等)、溶菌酶类和抗菌蛋白类,其中以昆虫抗菌肽类转基因研究最多、发展最快^[2]。张银东等^[17](2000)以“雪峰”辣椒为转基因试材,建立了以子叶为外植体,直接分化成苗的离体再生体系。利用农杆菌介导的三亲交配法将抗菌肽基因Cecropin B和Cecropin D导入辣椒,获得了再生植株,经PCR和Southern杂交检测,表明目的基因已整合到辣椒核基因组中,获得了转基因植株。李乃坚^[18](2000)将昆虫抗菌肽B、D基因构建而成的双价质粒pCDB-II以农杆菌为介导入5个栽培辣椒品种,共获得卡那霉素抗性植株1 200多株,随机选取70株,抽提其DNA进行点杂交检测,结果有15株显现阳性印迹。对这15株进行PCR检测,其中8株呈阳性,在125bp区有一条清晰的DNA谱带。对这8株进行了Southern blot分析,其中4株呈阳性。以卡那霉素抗性植株总数计算的Southern blot阳性率为5.7%。李颖等^[19](2005)利用通过农杆菌介导技术获得的T₀代转抗菌肽基因辣椒

植株为试材,对其自交株系世代群体连续进行抗青枯病鉴定筛选、分子生物学检测和系统选育,首次获得了具有抗青枯病能力的转抗菌肽基因辣椒稳定株系。同时,对其主要果实性状、青枯病抗性进行的对比试验结果表明,转抗菌肽辣椒株系除抗青枯病能力明显提高外,果实性状基本不变。

抗真菌的目的基因很少,目前主要实验应用的有3类:一是几丁质酶基因,其表达产物能够水解菌丝的生长点,从而抑制菌丝生长和孢子萌发;二是核糖体失活蛋白基因(RIP gene),能够防止真菌蛋白的表达;三是植物凝聚素基因,但并不是所有的植物凝聚素都有抗真菌的功能,其中一个家族—几丁质结合蛋白,能够破坏真菌的细胞壁而达到抗真菌的目的^[2]。Kim等^[20](1995)通过农杆菌将RIP基因转入辣椒获得了14个再生植株,检测证明再生植株都含有该基因,并且都可以遗传。另外,Mena等利用N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍诱变辣椒疫霉,富集游动孢子得到13个非致病突变体(NOP),用NOP游动孢子及菌丝接种辣椒幼苗和果实,均未产生辣椒疫霉病的病症。而且NOP突变的非致病表型至少能持续集25个无性世代。谢立波(2004)还利用农杆菌介导法将几丁质酶和 β -1,3葡聚糖酶基因导入辣椒,获得Km抗性植株后,经PCR检测,转基因植株扩增出专一条带,初步证明目的基因已经整合到辣椒基因组DNA中,获得阳性植株3株,阳性率为23.08%。

4 抗虫、除草剂转基因辣椒研究

目前应用广泛的抗虫基因主要有Bt基因、胰蛋白酶抑制剂基因和植物凝聚素基因等。柳建军等^[21](2001)利用根癌农杆菌介导和带柄子叶转化法将豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)基因转入辣椒栽培品种益都羊角椒中,共获得33株卡那霉素抗性再生植株,经PCR检测,有6个植株扩增产物中检测到与CpTI基因对应的326bp的电泳酶带,证明是转CpTI基因植株。王朋等^[22](2002)以基因型99-6的35 d龄叶片为外植体,用农杆菌介导把豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)基因导入辣椒,经多轮筛选培养,仅获得少数抗性绿芽,经Southern斑点杂交分析,结果表明,转化植株有杂交斑点,而非转化植株无杂交斑点,初步证实CpTI基因基本整合到辣椒基因组中。

此外,Nianion and Tdaftais等^[23](1996)通过农杆菌LBA 4404将带有pat基因的质粒pKB16.41导入红甜辣椒。首先,他们把辣椒的子叶及下胚轴

与农杆菌共染感。在分化再生芽时用 Km 作筛选, 经过 4 周后将再生芽转入含赤霉素(GA3)的伸长培养基中(也含 Km)。随后, 在含 Km 的生根培养基里进行不定根的诱导, 最后, 把再生苗转入土壤。试验表明, 转基因辣椒苗能耐受含 20% 磷丝菌素的商品除草剂 Basta 的浓度为 0.44%(Hoechst)。这一结果显示, *pat* 基因转化红甜辣椒对 PPT 的耐受力有了极大的提高。

5 展望

辣椒种质资源极为丰富, 栽培品种众多, 具有大量的近缘野生种。今后, 应尽快利用分子标记技术建立和完善辣椒基因图谱, 特别是鉴别和筛选与抗虫、抗病、丰产等重要性状有关的基因。辣椒基因工程在转移抗病和抗虫基因方面比较成功, 目前应尽快进行食品和环境的安全性评估, 尽早实现商业化开发。此外, 还应加强基因工程在辣椒果实营养品质、抗除草剂、抗生物和非生物胁迫等重要园艺性状改良方面的应用研究。辣椒转基因植物的研究进展较快, 前景也非常光明, 但转基因的应用仅是创造优良种质或品种的一条新的重要途径。只有转基因技术与育种学、病理学、栽培学等学科的密切结合, 才能进一步加快辣椒品种遗传改良的进程, 以满足市场对辣椒品种多样化与专用化的需求。

参考文献:

- [1] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 54 76.
- [2] 唐亮, 刘文轩. 辣椒再生体系的建立及基因工程研究进展[J]. 中国蔬菜, 2003, (6): 59 62.
- [3] 别之龙, 刘佩英. 辣椒的离体培养与遗传转化[J]. 长江蔬菜, 1996, (8): 1 5.
- [4] Liu W, Parroll W. A, Hildbebrand D. F, et al. Agrobacterium induced crown gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot like structures expressing introduced genes[J]. Plant Cell Report, 1990, 9(7): 360 364.
- [5] 王慧中, 赵培洁, 韩献忠. 转基因植株再生的研究[J]. 科技通报, 1994, 10(1): 30 32.
- [6] 王玉文, 杨美珠, 潘乃隧, 等. 甜椒的离体再生及基因转化[J].

植物学报, 1991, 33(10): 780 786.

- [7] 叶志彪, 李汉霞, 张健, 等. 辣椒转基因植株再生[J]. 植物学报, 1993, 35(增刊): 88 93.
- [8] 袁静, 吴涛, 刘中来. 影响农杆菌介导的辣椒基因转化因素的研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2003, 37(2): 227 230.
- [9] 周钟信, 贾密兰, 陈德芬, 等. 辣椒诱导再生及黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因转化研究初报[J]. 华北农学报, 1991, 6(4): 69 72.
- [10] 毕玉平, 单蕾, 王兴军, 等. 双抗 TMV+CMV 辣椒转基因工程植株再生及抗病毒鉴定[J]. 华北农学报, 1999, 14(3): 103 108.
- [11] 李华平, 胡晋生, 王敏, 等. 黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因转化辣椒研究[J]. 病毒学报, 2000, 16(3): 276 278.
- [12] Murphy, J. F, Kyle M. M. Isolation and viral infection of capsicum leaf[J]. Plant Cell Report, 1994, 13(7): 379 400.
- [13] 张宗江, 周钟信, 刘艳军, 等. 黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因转化辣椒及其在转基因株后代的表达[J]. 华北农学报, 1994, 9(3): 67 71.
- [14] Chunshi Dong. Transgenic sweet pepper plants containing CMV Sat RNA cDNA[J]. Acta Horticulturae, 1995, 402: 78 79.
- [15] Zhang Y. F. Transgenic sweet pepper plants from Agrobacterium mediated transformation[J]. Plant Cell Report, 1996, 16(1/2): 71 75.
- [16] 谢立波, 郭亚华, 邓立平, 等. 利用转基因技术培育甜椒新资源[J]. 北方园艺, 2004, (2): 43 45.
- [17] 张银东, 唐跃东, 曾宪松. 抗菌肽基因转化辣椒的研究[J]. 华南热带农业大学学报, 2000, 6(1): 1 4.
- [18] 李乃坚, 余小林, 李颖, 等. 双价抗菌肽基因转化辣椒[J]. 热带作物学报, 2000, 21(4): 45 51.
- [19] 李颖, 余小林, 李乃坚, 等. 转抗菌肽基因辣椒株系的青枯病抗性鉴定及系统选育[J]. 分子植物育种, 2005, 3(2): 217 221.
- [20] Kim Y. H. Improvement in plant disease resistance using an antifungal protein gene. Proceedings [J]. Vienna Austria, 1995, 7: 154 155.
- [21] 柳建军, 于洪欣, 崔德才, 等. 通过根癌农杆菌介导法将抗虫基因 C_pTI 导入辣椒的研究[J]. 山东农业科学, 2001, (4): 15 16.
- [22] 王朋, 王关林, 方宏筠. 抗虫基因(C_pTI)辣椒转化的初步研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(1): 30 32.
- [23] T daftari A. The development of herbicide tolerant transgenic crops[J]. Field Crop Research, 1996, 45: 115 123.

